

# Исследование биоэквивалентности препаратов ондансетрона с использованием метода ВЭЖХ-МС

Степанова Е.С.<sup>1</sup>, Овчаров М.В.<sup>1</sup>, Барсегян С.С.<sup>1</sup>,  
Чистяков В.В.<sup>1</sup>, Никонова С.М.<sup>2</sup>, Шилов В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», Центр коллективного пользования, г. Москва

<sup>2</sup> — ФБУН СЗНЦ «Гиgieny и общественного здоровья», г. Санкт-Петербург

**Резюме.** В рамках перекрёстного, открытого, рандомизированного исследования с недельным периодом отмывки, с двумя последовательностями была изучена биоэквивалентность двух таблетированных форм ондансетрона на 18 добровольцах (дозировка 8 мг). Образцы плазмы крови анализировали валидированным методом ВЭЖХ-МС, с внутренним стандартом — трописетроном. Предел количественного определения составил 1 нг/мл.

Для анализируемых препаратов рассчитаны фармакокинетические параметры:  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $MRT$ ,  $C_{max}/AUC$ . 90% доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений  $AUC_{0-t}$  составил 0,9507 — 1,0037, для  $AUC_{(0-\infty)}$  0,9402-0,9974 и для  $C_{max}$  — 0,9255 — 1,0095. По результатам исследования сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов ондансетрона.

**Ключевые слова:** ондансетрон, трописетрон, ВЭЖХ/МС, валидация, фармакокинетика, биоэквивалентность

## Bioequivalence study of ondansetron tablets by HPLC-MS

Stepanova E.S.<sup>1</sup>, Ovcharov M.V.<sup>1</sup>, Barsegyan S.S.<sup>1</sup>, Nikonova S.M.<sup>2</sup>, Shilov V.V.<sup>2</sup>, Chistyakov V.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — Peoples' Friendship university of Russia, Shared Research and Education Center, Moscow

<sup>2</sup> — Science Center «Hygiene and Public Health», St-Petersburg

**Abstract.** Within the cross, a single, open, randomized study with a week washout period, the two sequences has been studied bioequivalence of tablet forms two ondansetron 18 volunteers (8 mg dosage). Plasma samples were analyzed by a validated HPLC-MS, tropisetron was used as the internal standard. Limit of quantification was 1 ng/ml.

Analyzed for drugs following pharmacokinetic parameters were calculated:  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $MRT$ ,  $C_{max}/AUC$ . 90% confidence interval for log-transformed values of  $AUC_{0-t}$  was 0,9507 — 1,0037, of  $AUC_{(0-\infty)}$  was 0,9402-0,9974, of  $C_{max}$  was 0,9255 — 1,0095. The study concluded that bioequivalence compared ondansetron drugs.

**Keywords:** ondansetron, tropisetron, HPLC/MS, validation, pharmacokinetics, bioequivalence

Автор, ответственный за переписку:

Степанова Елена Сергеевна — ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», Центр коллективного пользования, г. Москва; адрес: Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8/2; e-mail: stepanova\_25@inbox.ru; тел.: +7 (985) 442-17-49

## Введение

Значительные успехи химиотерапии в последние годы основываются на развитии поддерживающей и сопроводительной терапии, что позволило сделать лечение пациентов с онкологическими заболеваниями более эффективным. Практически весь спектр цитостатических препаратов имеет ряд выраженных побочных эффектов. Тошнота и рвота относятся к наиболее частым осложнениям при проведении химиотерапии. Ещё совсем недавно около 10% больных отказывались от химиотерапии или прерывали её преждевременно из-за развития непереносимой тошноты и рвоты [1].

Ключевую роль в развитии острой тошноты и рвоты играет нейромедиатор — серотонин (5—НТ), высвобождение которого происходит при воздействии лучевой терапии или введении цитостатических препаратов из энтерохромаффинных клеток слизистой тонкой кишки.

Разработка и внедрение в широкую практику в начале 1990 г. антагонистов рецепторов 5—НТ<sub>3</sub> позволили кардинально уменьшить тошноту и рвоту при проведении химиотерапии. За счёт селективного действия, эти препараты практически полностью купируют тошноту и рвоту, имея при этом минимальные побочные эффекты [2].

Антагонисты 5-HT<sub>3</sub> рецепторов стали препаратами выбора среди противорвотных средств [3]. Внутри класса антагонистов 5-HT<sub>3</sub> рецепторов существенных различий между препаратами в отношении их эффективности не выявлено [4].

Выбор препарата лечения основывается на индивидуальных особенностях пациентов.

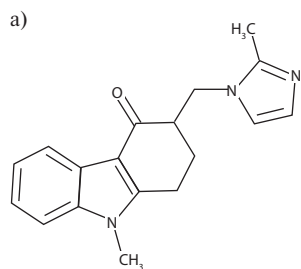
Ондансетрон — один из представителей группы антагонистов 5-HT<sub>3</sub> рецепторов успешно применяется в клинической практике для купирования тошноты и рвоты развивающейся на фоне химиотерапии, лучевой терапии, а также тошноты и рвоты возникающей в послеоперационный период.

### Цель исследования

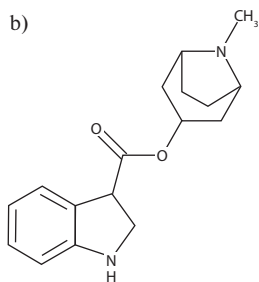
Целью настоящего исследования является изучение биоэквивалентности препаратов Ондавелл, таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 8 мг («ПТ. Новелл Фармасьютикал Лабораториз», Индонезия) и Эметрон®, таблетки, покрытые оболочкой 8 мг («Гедеон Рихтер А.О.», Венгрия).

### Материалы и методы

#### Субстанции



Ондансетрон (ОНД)  
Брутто формула: C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O  
Молекулярная масса: 293,15



Трописетрон (ТР)  
Брутто формула: C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Молекулярная масса: 284,15

#### Оборудование

Высокоэффективный жидкостной хроматограф «Dionex ultimate 3000» (ФРГ), с масс-детектором Bruker micrOTOF-Q II (ФРГ). Весы аналитические «MX5» «Mettler Toledo» (Швейцария).

Дозаторы переменного объёма на 50,0, 200,0 Колор «Ленпипет» (РФ) 1000,0; и 5000,0 мкл «Biohit» (Финляндия) со сменными одноразовыми пластиковыми наконечниками «Экохим» (РФ); аппарат для встряхивания жидкости «Genius 3», «Vortex» (США); центрифуга Centrifuge 5424, Eppendorf (ФРГ); пробирки

Эппендорфа «Экохим» (РФ); калиброванные мерные колбы вместимостью 50; 100; 250; 1000 мл (ГОСТ 1770-74), мерные цилиндры объёмом 50, 250, 1000 мл (ГОСТ 1770-74).

#### Реактивы и растворы

Субстанция ондансетрона гидрохлорида 92,16% (Sun Pharma), субстанция трописетрона гидрохлорида, ацетонитрил 99,9% (LabScan), ацетат аммония 99% (Fluka), кислота муравьиная 50% (Fluka), аргон 99,95%, азот (Dominick Hunter) 99 %, вода Milli-Q.

#### Пробоподготовка

В пробирку Эппендорфа 1,5 мл отбирали 200 мкл плазмы, белки осаждали 400 мкл ацетонитрила, содержащего 10 нг/мл трописетрона (ТР) — внутренний стандарт. Раствор перемешивали 5 с на вихревой мешалке. Образец центрифугировали 3 мин при 14000 об/мин. 400 мкл супернатанта отбирали в 1,5 мл флаконы, прибавляли 400 мкл воды и помещали в термостат авто-сAMPLера при 10°C для последующего хроматографического анализа.

#### Методика количественного определения

Для количественного определения ондансетрона в плазме крови добровольцев при исследовании биоэквивалентности использован валидированный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ/МС) [5].

#### Хроматографические условия:

- колонка XDB-C18 5 мкм 4,6×150 мм
- элюент — раствор 0,05% муравьиной кислоты и ацетонитрил в соотношении 25:75
- поток подвижной фазы — 0,6 мл/мин
- объём вводимой пробы — 50 мкл

#### Условия масс-детектирования:

Масс-детектор напряжение на игле -5500 В, температура источника 220°C, расход осушающего газа 6 л/мин, давление распыляющего газа 1,5 бар. Ионизация электрораспылением, регистрация положительных ионов, целевой ион ОНД 294,15±0,1 и ТР 285,15±0,1. Время удерживания ТР в этих условиях 4,21 мин, ОНД — 4,84 мин. Скорость записи спектров 1 Гц. Общее время анализа 5,5 мин.

Через каждые 50 анализов производилась промывка хроматографической системы в течении 40 мин при потоке 1 мл/мин, градиент: [% ацетонитрила] 25→0→0→100→100→25→25, время [мин] 0→1→5→20→25→27→40.

**Дизайн клинического этапа исследования**

Таблица 1

**Дизайн клинического этапа исследования**

|   |  |
|---|--|
| Участники исследования                      | 18 добровольцев в возрасте от 18 до 45 лет, отобранных согласно критериям включения и исключения (на случай замены выбывших из исследования добровольцев предусмотрено 2 дублера)                  |
| Доза  | 8 мг однократно  |
| Прием препарата                             | Доброволец натощак принимает 1 таблетку одного из препаратов, запивая 240 мл кипячёной воды комнатной температуры  |
| Период вымывания между этапами исследования | 7 дней   |
| Сбор образцов крови для анализа             | Всего у 18 добровольцев отобрано 504 образца крови в течение двух этапов исследования. Время отбора образцов: до и через 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 ч после приёма препарата |

**Расчёт фармакокинетических параметров**

Для обсуждения биологической доступности лекарственных средств рассчитывали концентрации ондансетрона в плазме крови и определяли фармакокинетические параметры:

- максимальная концентрация ( $C_{max}$ ) — максимальное значение из измеренных;
- время достижения максимальных концентраций ( $T_{max}$ ) — время, при котором измерялась  $C_{max}$ ;
- площадь под фармакокинетической кривой — в пределах длительности наблюдений ( $AUC_{0-t}$ ) рассчитывают методом трапеций;
- площадь под кривой в интервале времени от 0 до  $\infty$  ( $AUC_{0-\infty}$ );
- среднее время удержания препарата в организме (MRT);
- значение  $C_{max}/AUC_{0-t}$ , отражающее скорость всасывания.

Фармакокинетические параметры рассчитывали на компьютере Pentium 4 с использованием программ «Bioeqv», статистическая обработка данных проведена с использованием «Excel», графика — «SigmaPlot».

**Результаты****Калибровочная кривая**

Диапазон концентраций для калибровочной кривой выбрали в пределах от 1,0 до 50,0 нг/мл (рис. 1). Коэффициент корреляции R для кривой составил 0,9944. Калибровочная кривая описывалась уравнением  $y = 0,070332 \times x - 0,014394$ , где x — концентрация ОНД, y — отношение площадей хроматографических пиков ОНД к ТР.

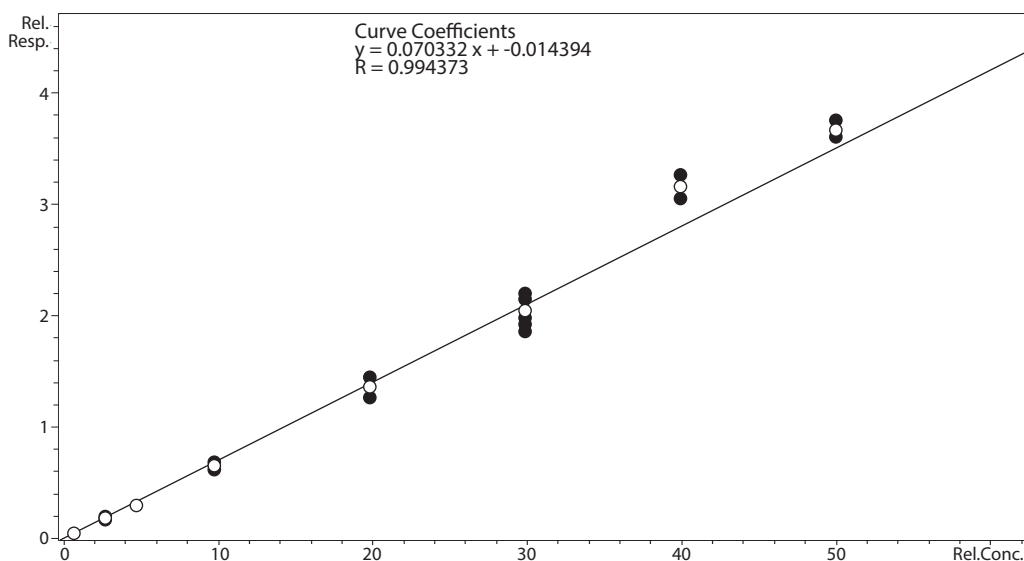
**Валидация методики**

Методика количественного определения ОНД была валидирована по нескольким параметрам, представленным в табл. 2, для доказательства её пригодности для исследований биоэквивалентности [6].

**Основные фармакокинетические параметры и статистическая обработка данных**

Усреднённые графики изменения концентрации ОНД в плазме крови добровольцев после приёма тестируемого и референтного препаратов представлены на рис. 6 (ср. значения  $\pm 90\%$  дов.инт.,  $n=18$ ). Видно, что профили концентраций ондансетрона после применения таблеток Ондавелл «ПТ Новелл Фармасьютикал Лабораториз» (Индонезия) повторяют профили концентраций ондансетрона при использовании таблеток референс-препарата Эметрон® «Гедеон Рихтер А.О.» (Венгрия).

Рассчитанные основные фармакокинетические параметры представлены в табл. 3. Максимальные



**Рис. 1.** График калибровки. Ось X (Rel.Conc.) — концентрация ОНД. Ось Y (Rel.Resp.) — отношение площадей хроматографических пиков ОНД к ТР

Таблица 2

## Характеристика валидационных параметров методики

| № п/п | Валидационный параметр                  | Результаты анализа  |
|-------|---|---|
| 1     | Селективность                           | Анализ нескольких образцов интактной плазмы крови и плазмы содержащей аналит доказал высокую селективность выбранной методики (рис. 2-5). В данных условиях эндогенные соединения не мешают определению анализируемого вещества и внутреннего стандарта.  |
| 2     | Предел обнаружения                      | 0,1 нг/мл, отношение интенсивности сигнала вещества и шума (S/N) равно 4:1.   |
| 3     | Предел количественного определения      | Нижний предел количественного определения ОНД равный нижней точке калибровочной кривой составил 1 нг/мл (рис. 3).   |
| 4     | Линейность, точность, воспроизводимость | График калибровки описывается линейным уравнением $y=0,070332 \times x - 0,014394$ , где $x$ — концентрация ОНД, $y$ — отношение площадей хроматографических пиков ОНД к ТР. Относительное стандартное отклонение (RSD) для всех точек калибровочной кривой не превышает 15%, точность относительно теоретических концентраций от 91,4 до 112,4%. |
| 5     | Извлечение                              | Около 100%.   |
| 6     | Эффект влияния матрицы                  | Не более 17,5%.   |
| 7     | Стабильность в автосамплере             | Исследована путём сравнения площадей хроматографических пиков полученных при первичном анализе пробы и повторном анализе после выдерживания образца в термостатируемом автосамплере при 10°C в течение 10 часов. Влияние внешних факторов на стабильность образца составило не более 4%.  |
| 8     | Эффект переноса                         | Исследован при последовательном анализе образца с концентрацией ОНД 30 нг/мл и образца, не содержащего аналит. Перенос ОНД отсутствует.   |

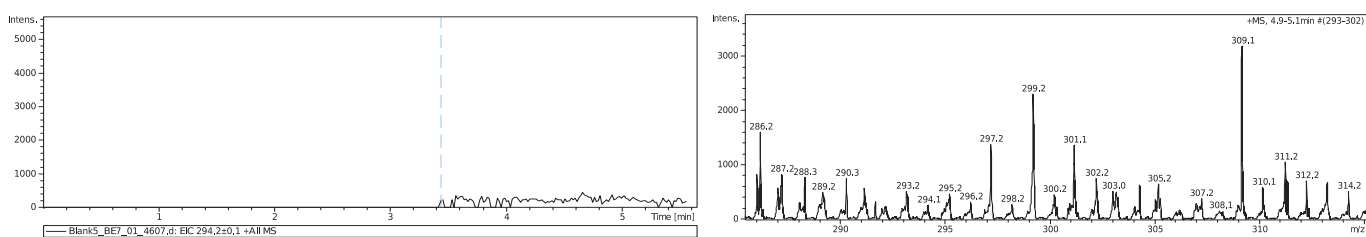


Рис. 2. Типичная хроматограмма и масс-спектр плазмы крови, не содержащей ОНД

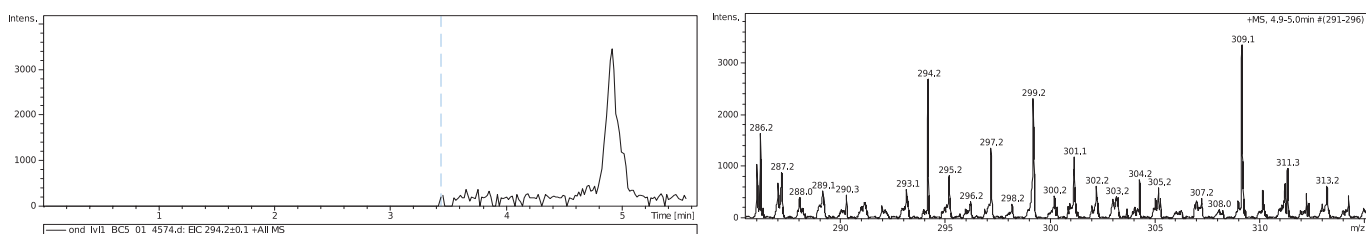


Рис. 3. Хроматограмма и масс-спектр плазмы крови с концентрацией ОНД 1 нг/мл

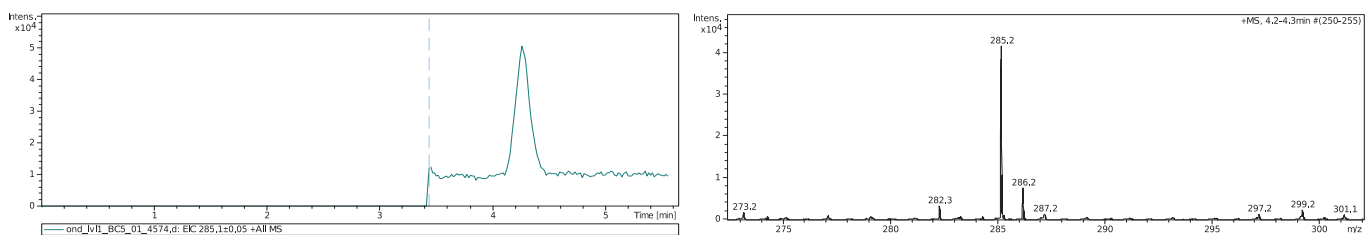


Рис. 4. Хроматограмма и масс-спектр плазмы крови, содержащей внутренний стандарт ТР

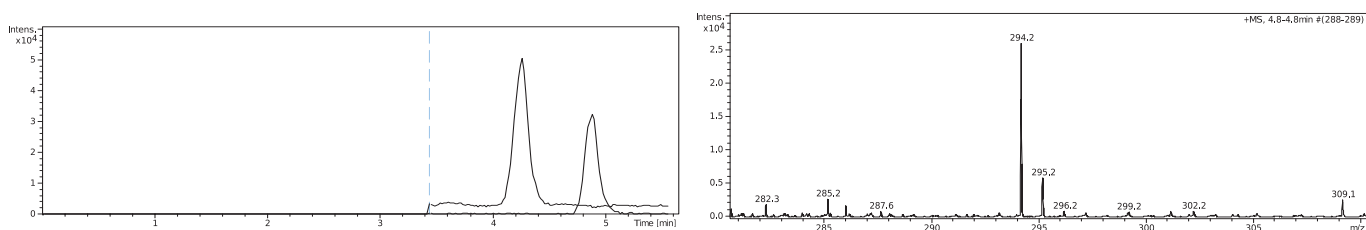
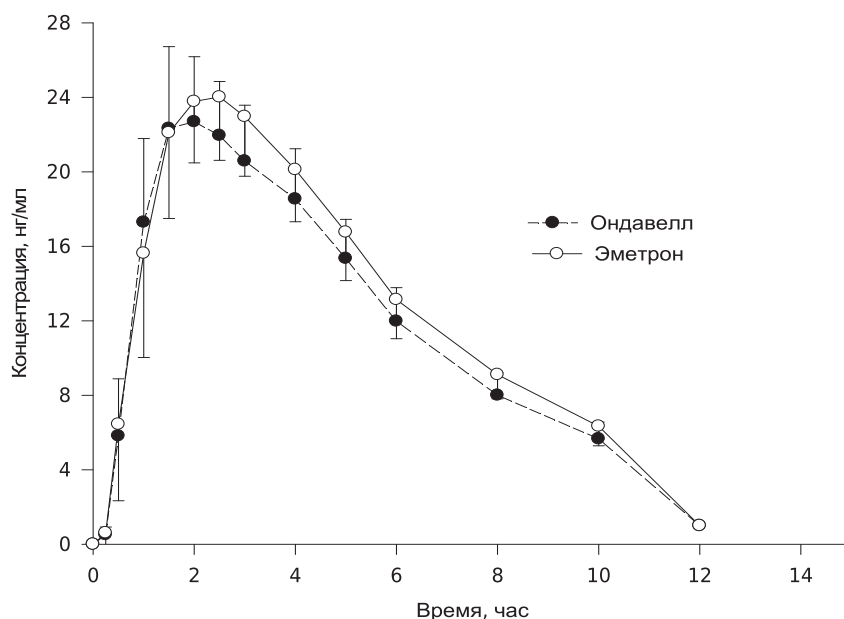


Рис. 5. Типичная хроматограмма и масс-спектр плазмы крови добровольца содержащая ОНД и внутренний стандарт ТР



**Рис. 6.** Усреднённые кинетические кривые ОНД в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток Ондавелл (Т) и Эметрон (Р) (n=18;  $\bar{x} \pm C.I. 90\%$ )

Таблица 3

**Основные фармакокинетические параметры тестируемого и референтного препаратов**

|                             |   | $\bar{x}$ | SD    | $S_{\bar{x}}$ | C.I. 90% | CV, % |
|-----------------------------|---|-----------|-------|---------------|----------|-------|
| $C_{max}$<br>нг/мл          | T | 25,42     | 9,86  | 4,02          | 3,82     | 38,79 |
|                             | R | 27,60     | 10,65 | 4,35          | 4,13     | 38,59 |
| $T_{max}$<br>ч              | T | 2,14      | 0,74  | 0,30          | 0,29     | 34,77 |
|                             | R | 2,33      | 0,99  | 0,40          | 0,38     | 42,22 |
| MRT<br>ч                    | T | 4,62      | 0,45  | 0,18          | 0,17     | 9,74  |
|                             | R | 4,83      | 0,54  | 0,22          | 0,21     | 11,13 |
| $AUC_{0-12}$<br>нг/мл×ч     | T | 138,93    | 51,52 | 21,03         | 19,97    | 37,08 |
|                             | R | 153,15    | 56,63 | 23,11         | 21,95    | 36,98 |
| $AUC_{0-\infty}$<br>нг/мл×ч | T | 140,40    | 52,76 | 21,53         | 20,45    | 37,58 |
|                             | R | 160,19    | 57,69 | 23,55         | 22,37    | 36,01 |
| $C_{max}/AUC_{0-12}$        | T | 0,183     | 0,025 | 0,010         | 0,010    | 13,71 |
|                             | R | 0,181     | 0,027 | 0,011         | 0,010    | 14,76 |

**Примечания:**  $\bar{x}$  — среднее арифметическое; SD — стандартное отклонение;  $S_{\bar{x}}$  — стандартная ошибка; C.I. 90% — 90% доверительный интервал; CV — коэффициент вариации.

концентрации регистрируются спустя, в среднем, 2,14-2,33 ч после приёма препаратов и составляют для тестируемого препарата ( $\bar{x} \pm C.I. 90\%$ )  $25,42 \pm 3,82$  нг/мл, для препарата сравнения —  $27,60 \pm 4,13$  нг/мл. Параметр среднего времени удерживания (MRT) составил, соответственно,  $4,62 \pm 0,17$  и  $4,83 \pm 0,21$  ч. Нет достоверных различий и в параметре AUC, отражающем степень всасывания. Для тестируемых таблеток  $AUC_{0-12}$

Таблица 4

**Результаты дисперсионного анализа фармакокинетических параметров  $\ln AUC_{0-t}$ ,  $\ln C_{max}$  определяющих биодоступность ондансетрона из таблеток**

| $\ln AUC_{0-12}$    |       |    |       |         |
|---------------------|-------|----|-------|---------|
| Источник вариации   | SS    | DF | MS    | F       |
| Препарат            | 0,106 | 1  | 0,106 | 1,86496 |
| Последовательность  | 0,083 | 1  | 0,083 | 1,45607 |
| Испытуемые          | 4,012 | 17 | 0,236 | 4,14688 |
| Остаточная вариация | 0,911 | 16 | 0,057 | -       |
| Общая вариация      | 5,112 | 35 | -     | -       |

| $\ln C_{max}$       |       |    |       |         |
|---------------------|-------|----|-------|---------|
| Источник вариации   | SS    | DF | MS    | F       |
| Препарат            | 0,082 | 1  | 0,082 | 1,47759 |
| Последовательность  | 0,076 | 1  | 0,076 | 1,37413 |
| Испытуемые          | 4,814 | 17 | 0,283 | 5,11766 |
| Остаточная вариация | 0,885 | 16 | 0,055 | -       |
| Общая вариация      | 5,857 | 35 | -     | -       |

**Примечания:** SS — сумма квадратов отклонений; DF — число степеней свободы; MS — средняя квадратичная ошибка; F — рассчитанное значение F-критерия Фишера (при уровне значимости  $\alpha=5\%$ ).

( $AUC_{0-\infty}$ ) —  $138,93 \pm 19,97$  ( $140,40 \pm 20,45$ ), для препарата сравнения —  $153,15 \pm 21,95$  ( $160,19 \pm 22,37$ ) нг/мл×ч. Отношения максимальных концентраций к площадям под фармакокинетическими кривыми  $C_{max}/AUC_{0-12}$ , отражающие скорость всасывания, для сравниваемых лекарственных препаратов, практически одинаковы и составили  $0,183 \pm 0,010$  (тест препарат) и  $0,181 \pm 0,010$  (препарат сравнения).



Таблица 5

## Значения фармакокинетических параметров после логарифмической трансформации данных

| Параметр                     |       | Ондавелл | Эметрон® | Отношение T/R, % | Границы 90% CI, % |
|------------------------------|-------|----------|----------|------------------|-------------------|
| $AUC_{0-12'}$<br>нг/мл×ч     | GMean | 4,845    | 4,958    | 97,72            | 95,07–100,37      |
|                              | SD    | 0,407    | 0,358    |                  |                   |
|                              | CV, % | 8,383    | 7,206    |                  |                   |
| $AUC_{0-\infty'}$<br>нг/мл×ч | GMean | 4,853    | 5,009    | 96,88            | 94,02–99,74       |
|                              | SD    | 0,414    | 0,341    |                  |                   |
|                              | CV, % | 8,495    | 6,795    |                  |                   |
| $C_{max}$<br>нг/мл           | GMean | 3,122    | 3,227    | 96,75            | 92,55–100,95      |
|                              | SD    | 0,438    | 0,384    |                  |                   |
|                              | CV, % | 13,88    | 11,84    |                  |                   |

Примечание: GMean — среднее геометрическое

Для установления статистически значимых различий между препаратами проводили дисперсионный анализ значений  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  после их логарифмического преобразования (табл. 4).

Для установления статистически значимых различий между средними значениями показателя биоэквивалентности сравниваемых препаратов значение F для строки «препарат» (различия между препаратами) должно превышать соответствующее табличное значение (таблица критерия Фишера для числа степеней свободы (1; n-2) и выбранного уровня значимости  $\alpha$ ).

Критическим значением для оценки вклада факторов типа препарата является значение  $F_{0,05;1;16} = 4,49$ . Как можно видеть, F-отношение для вклада фактора типа препарата нигде не превосходит этого критического значения.

Оценка биоэквивалентности изучаемых препаратов проводилась по показателям:  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$ . В табл. 5 приведены границы 90% доверительного интервала для логарифмически преобразованных рас-

считанных фармакокинетических параметров:  $AUC_{(0-t)}$  95,07%-100,37%; для  $AUC_{(0-\infty)}$  94,02%-99,74%, для  $C_{max}$  92,55%-100,95%.

## Выводы

Значения всех определяемых параметров статистически достоверно не различались. Дисперсионный анализ значений  $\ln AUC_{0-12'}$ ,  $\ln C_{max}$ , проведенный после их логарифмического преобразования, не выявил статистически значимых различий между препаратами. Границы оцененного 90% доверительного интервала для индивидуальных отношений логарифмически преобразованных значений (табл. 4) находятся в допустимых пределах: 80-125% для  $AUC_{0-12}$  и  $AUC_{0-\infty}$  и 75-133% для  $C_{max}$  [7].

Таким образом, препарат Ондавелл, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 8 мг («ПТ. Новелл Фармасьютикал Лабораториз», Индонезия) и препарат Эметрон®, таблетки, покрытые оболочкой, 8 мг («Гедеон Рихтер А.О.», Венгрия) биоэквивалентны.

## Литература

1. Kris M.G., Hesketh P.J., Herrstedt J., Rittenberg C., Einhorn L.H., Grunberg S. et al. Consensus proposals for the prevention of acute and delayed vomiting and nausea following high — emetic — risk chemotherapy. // Support Care Cancer 2005, Vol. 13:85–96.
2. Oge A., Alkis N., Oge O., Kartum A. Comparison of granisetron, ondansetron and tropisetron for control of vomiting and nausea induced by cisplatin. // J Chemother 2000, Vol. 12(1):105-108.
3. Steven M. Grunberg, and Paul J. Hesketh. Control of Chemotherapy—Induced Emesis. // The New England journal of medicine, 1993, Vol. 329:1790—1796.
4. Stiakaki E., Savvas S., Lydaki E., Bolonaki I., Kouvidi E., Dimitriou H., et al. Ondansetron and tropisetron in the control of nausea and vomiting in children receiving combined cancer chemotherapy. // Pediatr Hematol Oncol. 1999, Vol. 16(2):101-108.
5. Yara Popst Armando, Simone Grigoletto Schramm, Marina de Freitas Silva, Eunice Kazue Kano. Bioequivalence assay between orally disintegrating and conventional tablet formulations in healthy volunteers. // International Journal of Pharmaceutics, 2009, Vol. 366, 149—153.
6. Guideline on bioanalytical method validation. // European Medicines Agency, 2011.
7. Методические рекомендации «Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств, гл. 7 в «Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. — М.: Гриф и К, 2013.